

19 Japan Patent Office (JP)
12 Kokai Patent Office (A)
11 Document Number Hei 3-167288
43 Publication Date July 19, 1991
51 Int.Cl.⁵ ID Code Intrabureau Classification No.
C 09 K 11/06 Z 7043-4H
G 01 N 21/76 7055-2G

Request for Examination Not Requested

Number of Claims 4 (8 Pages Total)

54 Title of the Invention Method of Aequorin Luminescence
Sensitization by Surfactants
21 Application Number Hei 1-307294
22 Application Date November 27, 1989
72 Inventor ZENNO Osamu
10-3 Otohe-cho Kanazawa-ku Yokohama-shi Kanagawa-ken
72 Inventor INOUE Satoshi
7-ban 3-shi 2-chome Maru-no-nai Chiyoda-ku Tokyo
within Chisso, K.K.
71 Applicant Chisso, K.K.
6-32-bango 3-chome Nakanoshima Osaka-shi Osaka-fu
74 Agent Attorney SASA'I Yataro and 1 other

Specifications

1. Title of the Invention

Method of Aequorin Luminescence Sensitization by Surfactants

2. Claims

(1) A method of luminescence sensitization which is characterized by the coexistence of surfactants in luminescent methods that use aequorin and its derivatives.

(2) A method of luminescence sensitization of description in the Claim 1 which uses anionic surfactants, cationic surfactants, amphoteric surfactants, non-ionic surfactants, natural surfactants, polymer surfactants or specific surfactants as the surfactants.

(3) A method of luminescence sensitization of description in Claim 1 with variant aequorin, semi-synthetic aequorin or semi-synthetic variant aequorin as the aequorin derivatives.

(4) Stable preservation methods of regenerated aequorin which are characterized by the coexistence of surfactants with aequorin.

3. Detailed Explanation of the Invention

[Industrial Field of Utilization]

This invention pertains to a method of aequorin luminescence sensitization which is characterized by the coexistence of surfactants in bioluminescence reaction series made from aequorin or its derivatives.

[Prior Art and Its Problems]

Luminescent protein aequorin is a calcium fused protein that is isolated by [untranslatable: owankurage] and, as apoaequorin of the protein component in the natural world, forms complexes by means of molecular oxygen with celenterazines of substrate

components. Luminescence is due to the calcium bonding in this complex. The calcium concentration can be determined using this luminescence.

These others used recombinant DNA methods and cloned cDNA of apoaeguorin by luminescent [untranslatable: owankurage] and then clarified its manufacture (Japanese Published Patent No. S61-135,586).

Then, using this cDNA, *Escherichia coli* are hosted are

/2

the production of apoaeguorin was realized inside and outside the bacteria (Japanese Published Patent No. S62-171,695, Japanese Published Patent No. S63-102,695 and its refining process was also realized (Japanese Published Patent No. H1-132,397).

Further, aequorin genes, which were bonded with functional genes, were manufactured and realized for its fused protein manufacture (Japanese Published Patent No. S64-39,990 and Japanese Patent Application No. S63-308,424) and its refining process was also realized (Japanese Patent Application No. H1-69,862).

Thus, metal detection methods and immunoassay methods were developed which used the aequorin and its fused proteins (Japanese Published Patent No. S62-261,942 and Japanese Patent Application No. H1-74,742).

This invention is a is a report pertaining to luminescence sensitization methods by surfactants.

Thus, the usefulness of aequorin is known to those skilled in the art; the luminescence of aequorin is utilized and various

substances can be detected. Further, there is the possibility of the determination and detection in ones like immunoassays and DNA probes and bioassays and the usefulness as a verification agent as those like diagnostic agents is determined from the above-mentioned functions.

These inventors, in view of the above-mentioned technological items, could develop luminescence sensitization by surfactants. As seen in the following explanation, the objective of this invention is the offering of luminescence sensitization technology for application to ultra-high sensitivity determination methods by aequorin.

[Means for Solving the Problems]

This invention is constituted by the following (1)~(4).

(1) Methods of luminescence sensitization which are characterized by the coexistence of surfactants in luminescence methods using aequorin and its derivatives.

(2) Methods of luminescence sensitization of description in the aforementioned Item No.1 which use anionic surfactants, cationic surfactants, amphoteric surfactants, non-ionic surfactants, natural surfactants, polymer surfactants or specific surfactants as the surfactants.

(3) Methods of luminescence sensitization of description in the aforementioned Item No. 1 wherein the aequorin derivatives are variant aequorin, semi-synthetic aequorin or semi-synthetic variant aequorin.

(4) Stable preservation methods of regenerated aequorin which

are characterized by the coexistence of surfactants in aequorin.

The embodiments and results of this invention are discussed in the following. This invention has methods of aequorin luminescence sensitization by surfactant catalytic effects which can be performed, for example, as in the methods shown by the following Actual Examples.

In the methods of this invention, there are the following with compounds having four member ring peroxide structures as shown in Figure No. 1 being dioxatanes; as celenterazines, there are compounds having structures such as shown in Figure No. 2; as aequorins, there are complexes having structures such as shown in Figure No. 3; as aequorin derivatives, there are the variant aequorins with apoaequorin components substituted for variant apoaequorins, synthetic aequorins with celenterazine components substituted for celenterazine derivatives and semi-synthetic variant aequorins with both of these substitutions.

Further, ones like the compounds shown in the following Table No. 1 are given as surfactants. Substances shown in the following Table No.2 are considered as fluorescent substances such as extending the time as increase granting agents.

Table No. 1
Various Surfactants

1. Anionic Surfactants

- 1.1. soap → soap, metallic soap
- 1.2. Turkey red oil → [untranslatable: monopooru] oil
- 1.3. higher alcohol sulfates
- 1.4. alkylbenzene sulfonate-ABS, LAS
- 1.5. α -olefin sulfonate
- 1.6. phosphate type anionic surfactants

2. Cationic Surfactants

2.1. amine salt type surfactants

alkyl amine salt type, amino alcohol resin acid
derivative type, polyamine resin acid derivative
type, imidazoline type

2.2. tertiary ammonium salt type cationic surfactants

alkyltrimethyl ammonium salt type, dialkyldimethyl
ammonium salt type, alkyl dimethyl benzyl ammonium salt
type, pyridinium salt type, alkylisoquinolinium salt
type, benzetonium chloride type

Continuation of Table No. 1

3. Amphoteric Surfactants

3.1. amino acid type amphoteric surfactants

alanine type, glycine type

3.2. betaine type amphoteric surfactants

4. Non-ionic Surfactants

4.1. amido resinate type ionic surfactants

4.2. polyhydric alcohol type non-ionic surfactants

4.3. polyethylene glycol type non-ionic surfactants

5. Natural Surfactants

5.1. phospholipid surfactants

5.2. amino acid type surfactants

6. Polymer Surfactants

6.1. natural polymer surfactants

6.2. synthetic polymer surfactants

7. Specific Surfactants

7.1. silicone type surfactants

7.2. fluoride surfactants

Table No. 2
(Various Fluorescent Substances)

Fluorescent Substances	Fluorescent Substances
perilene	9,10-dibromoanthracene
luparen	riboflavin
rodamine B	fluorocene
DNS-alanine	SBD-mercapto ethanol
3-methyl cholanthrene	unberyferon[?]
rosebengal	α -tocopherol
benzo-(α)-pyrene	NADH
NBD-proline	pyridoxine . hydrochloride

Note. NBD: 7-nitrobenzofurazan derivatives
 sbd: 7-sulfonylbenzofurazan derivatives

The methods of this invention are performed as by the following examples.

The respective requisite amounts of Tris HCl EDTA buffer and celenterazine methanol solution are mixed for set amounts of aqueous solution of aequorin or aequorin derivatives, then diluted with the requisite amount of water and solution for incubation is produced.

In the following adjustment, for example, 20-100 μ l of 200 mM Tris HCl 100 mM EDTA buffer and 2-20 μ l of methanol solution of

colcenterazines (200 mg/ml) and 2-20 μ l of 2-mercapto ethanol as the reducing agent are mixed when using 50 μ l of apoaeguorin (10 ng/ μ l) aqueous solution, and diluted with water to 200-2,000 μ l (dilute solution). The above-mentioned mixture dilution process is performed for 5 minutes-1 hour in the open air at 0°C-room temperature.

Then, the incubation of the dilute solution is performed for 5-100 hours, desirably 10-40 hours, at a set temperature which is desirably between 0°C-15°. After the said incubation, the dilute solution is taken by tubes in fixed amounts (for example, 50 μ l) each; the set surfactants which are diluted to set concentrations are added and mixed and sampling (for example, 10 μ l) is done at set periods at a set temperature (for example, 4°) of 0°C-room temperature; for the said sampling, an adequate amount of Ca^{2+} (for example, 100 μ l of 30 mM CaCl_2 , 30 mM Tris HCl (pH7.5) aqueous solution) is added and luminescent intensity (for example, aequorin activity) was determined using luminescence intensity determination equipment (lumiphotometer).

Further, the type of the said surfactants of the above-mentioned surfactants which are utilized for addition are not limited; all of the above recorded (1) anionic surfactants, (2) cationic surfactants, (3) amphoteric surfactants, (4) non-ionic surfactants, (5) natural surfactant and (6) polymer surfactants and specific surfactants can be used.

Also, the selection of surfactants should be selected upon the preparation experiments such as conforming to the conditions of

incubation for the type of utilized aequorin or aequorin derivative, type and utilized amount of complementary solution, type and utilized amount of reducing agent.

Also, the relative activity for the above-mentioned luminescence intensity is shown with the % as 100 for the aequorin activity of time 0 (note, time lapse zero) of the samples which is determined by being realized in the same manner as in the manufacture of the above-mentioned luminescence intensity sample although without the addition of surfactants (note, refer to the following Table No. 3).

/4

The methods of this invention (invention of the aforementioned (4)) also have stable preservation methods for regenerated aequorin by the addition of surfactant to the regenerated aequorin.

The regenerated aequorin is aequorin that is obtained by reactions in complementary solution with apoaequorin and celenterazine as in the above-mentioned, for example. The methods which combine surfactant to the said additives and methods which combine surfactants to regenerated aequorin (solution) are the same as the above-mentioned. As clarified from the following Table No. 4, a relatively long time (note, 10-20 hours or more) is required to attain the highest capability of aequorin activity (note, luminescence capacity) even as maintained at a suitable temperature for its given state (note, solution state which is regenerated in reactions). For this, when done by the methods of this invention, the aequorin activity can be remarkably improved by the addition of

the usual surfactants (0.01-10 mg/l, desirably 0.1-1 mg/l) coming to the state of a relative activity of 100% at between 2-4 hours when done in the desired addition conditions; 300-700% was attained under the desired addition conditions which improve the relative activity even more.

[Results of the Inventions]

The usefulness of methods related to aequorin luminescence sensitization of this invention are self-evident to ones skilled in the art. Further, aequorin luminescence sensitization becomes possible by the coexistence of suitable fluorescent substances. These type of substances are commonly known to one skilled in the art.

Ones skilled in the art can realize this patented recorded invention from the aforementioned indications. However, the device used for the important aequorin luminescence sensitization in this invention is clarified by the actual examples for the increase of understanding of this technology.

[Actual Examples]

Actual Example 1 [Aequorin Luminescence Sensitization
Time Lapse Under the Coexistence of
Surfactants]

50 μ l of apoaequorin (10 ng/ μ l) aqueous solution, 50 μ l of 200 mM Tris HCl (pH7.6) 100 mM EDTA buffer, 5 μ l of celenterazine (200 mg/ml) methanol solution, and 5 μ l of 2-mercapto ethanol were mixed and finally brought to 500 μ l with water.

After mixing, [this] was incubated for 26 hours at 4°C. 50 μ l

each was allocated to individual tubes, and 50 μ l of the respective concentrations of the surfactant (trade name) Tween (20, 40, 60, 80, 85) were added to the respective tubes; after mixing, this was incubated in ice water. 10 μ l sampling was done at set periods and luminescence intensity (aequorin activity) of these samples was determined by lumiphotometer (TD4000) after 100 μ l additions of 30 mM CaCl_2 , 30 mM Tris HCl (pH7.6) aqueous solution. The results are shown in Table No. 3.

Table No. 3

界面活性剤		(相対活性、%)			
種類	濃度 (mg/ml)	0hr	1hr	2hr	15hr
Tween 20	1	(223)	(167)	(163)	(170)
	0.1	(122)	(123)	(142)	(140)
Tween 40	1	(117)	(118)	(103)	(120)
	0.1	(90)	(77)	(63)	(28)
Tween 60	1	(125)	(120)	(117)	(117)
	0.1	(117)	(120)	(120)	(48)
Tween 80	1	(133)	(123)	(125)	(112)
	0.1	(118)	(113)	(117)	(167)
Tween 85	1	(115)	(118)	(117)	(145)
	0.1	(95)	(98)	(110)	(175)
対照	0	(100)	(67)	(56)	(28)

[Key to Table No. 3]

- 1 Surfactant
- 2 (relative activity, %)
- 3 type
- 4 concentration (mg/ml)
- 5 none

/5

Actual Example 2 [Aequorin Regeneration Time Lapse Under the

Coexistence of Surfactants]

The respective concentrations of surfactants (Tween 20, 40, 60, 80, 85) coexisted with the Actual Example 1 aequorin regeneration series and were regenerated in ice water.

Sampling was after a set time and luminescence intensity (aequorin activity) was determined by lumiphotometer (TD4000) after the addition of 100 μ l of 30 mM CaCl_2 , 30 mM Tris HCl (pH7.6) aqueous solution.

The results are shown in the following Table No. 4. Aequorin luminescence sensitization was seen for all of the Tween [ones] at the concentrations of 0.1 mg/ml, but the regeneration rate was not increased.

Table No. 4 (Aequorin Regeneration Time Lapse)

界面活性剤		(相対活性、%)						
種類	濃度 (mg/ml)	0.5hr	1hr	2hr	3.5hr	6hr	10hr	23hr
Tween 20	1	(11)	(16)	(21)	(59)	(111)	(142)	(226)
	0.1	(37)	(84)	(179)	(300)	(432)	(563)	(689)
Tween 40	1	(0)	(5)	(18)	(26)	(47)	(100)	(188)
	0.1	(21)	(58)	(121)	(226)	(342)	(447)	(563)
Tween 60	1	(0)	(0.5)	(11)	(21)	(32)	(47)	(42)
	0.1	(32)	(59)	(83)	(221)	(321)	(411)	(468)
Tween 80	1	(0)	(0)	(5)	(11)	(37)	(53)	(105)
	0.1	(21)	(42)	(121)	(153)	(300)	(400)	(574)
Tween 85	1	(5)	(26)	(68)	(111)	(232)	(279)	(442)
	0.1	(26)	(53)	(153)	(237)	(368)	(518)	(621)
なし	0	(0.5)	(5)	(28)	(53)	(84)	(89)	(100)

[Key to Table No. 4]

- 1 Surfactant
- 2 (Relative Activity, %)
- 3 Type
- 4 Concentration (mg/ml)
- 5 none

/6

Surfactants from the ones above have enhanced aequorin luminescence even before and after aequorin regeneration and the preservation of a stable structure of aequorin is understood.

Further, the sensitization of the aequorin luminescence can be maintained by the coexistence of fluorescent substances such as shown in Table No. 2. Also, the aequorin luminescence such as shown in Table No. 4 is produced via [untranslatable: diokusetan; see revision:dioxatane] intermediates; thus, sensitization of the same manner as surfactants also in the chemiluminescent reactions of ones like the dioxatane class and celenterazine are expected to be produced.

5. Simple Explanation of the Figures

Figures No. 1-4 are explanatory diagrams of this invention.

Figure No. 1 shows the chemical structure of dioxatane. Figure No. 2 shows the chemical structure of celenterazine. Figure No. 3 shows an abbreviated diagram of the structure of aequorin. Figure 4 shows the mechanism of aequorin luminescence and regeneration.

The End

Patent Applicant	Chisso, K.K.
Agent Attorney	SASA'I Yataro
Same as Above	NONAKA Katsuhiko

Figure No. 1

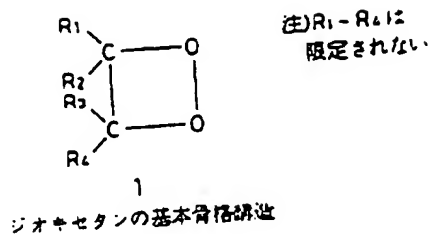
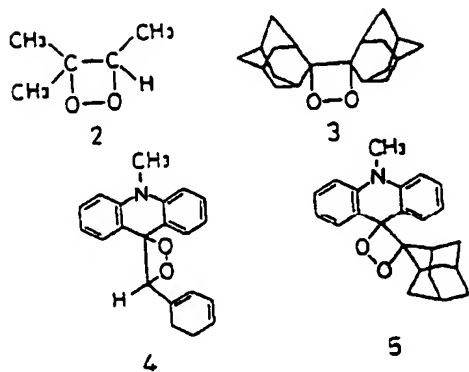
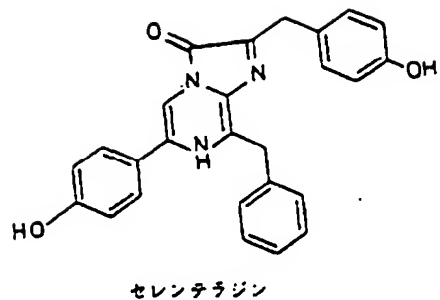


Figure No. 2



ジオキセタン類の一例

[Key to Figures No. 1 and 2]

- 1 Note) R₁-R₄ are not restricted.
- 2 substrate skeleton structure of dioxatane
- 3 examples of a dioxatane class
- 4 celenterazines

Table No. 3

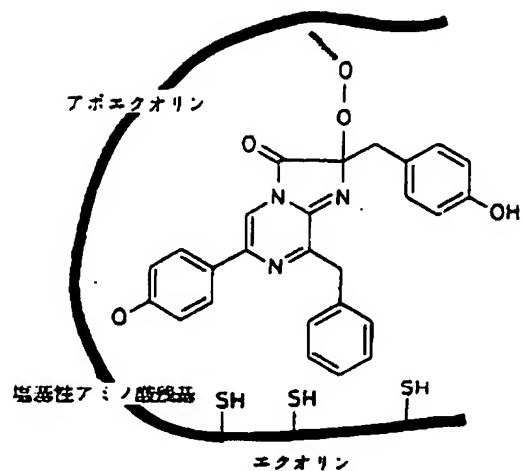
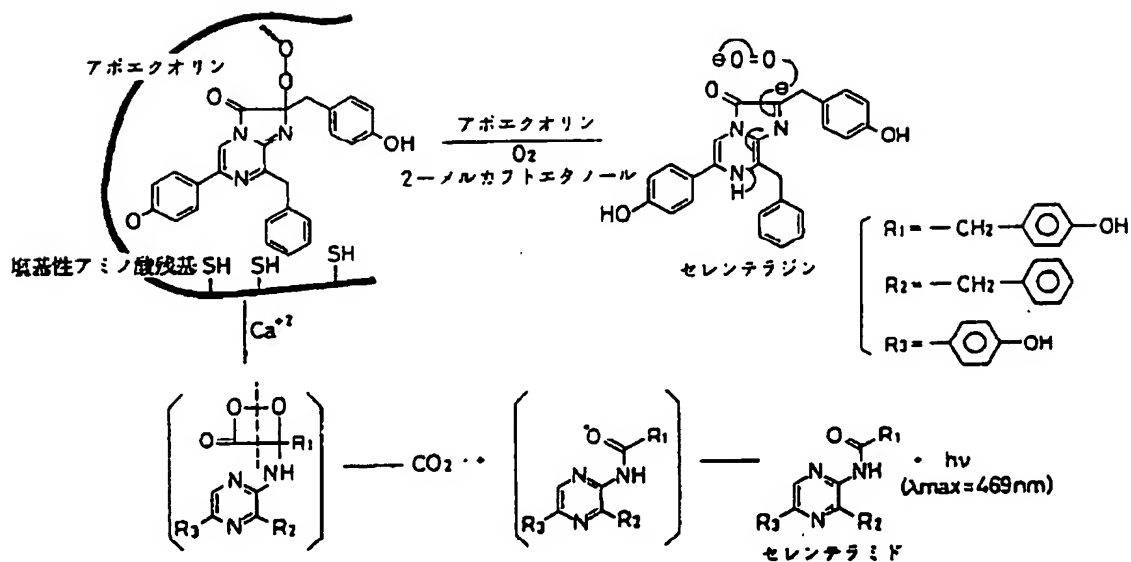


Table No. 4



[Key to Figures No. 4 and 5] エクオリンの発光、再生のメカニズム

- 1 apoequorin
- 2 basic amino acid residue
- 3 aequorin
- 4 apoequorin

- 5 basic amino acid residue
- 6 apoaequorin
- 7 2-mercapto ethanol
- 8 celenterazine
- 9 celenteramide
- 10 mechanism of aequorin luminescence and regeneration

Procedural Revision

February 7, 1990

[stamp]

Patent Office Director Mr.

1. Indication of Item

Japanese Patent Application No. H1-307,294

2. Title of the Invention

Method of Aequorin Luminescence Sensitization by Surfactants

3. Person Doing the Revision

Relationship with the Item Patent Applicant

(Postal Code 530) 6-32-bango Three-chome Nakanoshima Osaka-shi

Osaka-fu

(207) Chisso, K.K.

Representative NOGI Sadao

4. Agent (Postal Code 104) 4-15-bango 4-chome Sakuchi Chuo-ku

Tokyo

Higashi Ginza Royal Heights Room No. 403

(8851) Attorney NONAKA Katsuhiko [stamp]

(Telephone 545-0630)

5. Type of Attached Revision

Spontaneous Revision

6. Number of Inventions Added by the Revision

none

7. Subject of the Revision

Detailed Explanation of the Invention section of the

Specifications

8. Revision Content

Specifications revised as follows.

- (1) "jiokusetan" of 4th row from the bottom of page no. 4 is revised to "dioxatane".

The End

[stamps]

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-167288

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)7月19日

C 09 K 11/06
G 01 N 21/76

Z 7043-4H
7055-2G

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全8頁)

⑮ 発明の名称 界面活性剤によるエクオリンの増感発光法

⑯ 特 願 平1-307294

⑰ 出 願 平1(1989)11月27日

⑱ 発 明 者 善 野 修 平 神奈川県横浜市金沢区乙船町10-3

⑲ 発 明 者 井 上 敏 東京都千代田区丸の内2丁目7番3市 チツソ株式会社内

⑳ 出 願 人 チツソ株式会社 大阪府大阪市北区中之島3丁目6番32号

㉑ 代 理 人 弁理士 佐々井 弥太郎 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

界面活性剤によるエクオリンの増感発光法

2. 特許請求の範囲

(1) エクオリン及びその誘導体を用いる発光法に

おいて界面活性物質を共存させることを特徴とする増感発光法。

(2) 界面活性物質として陰イオン界面活性剤、陽イオン界面活性剤、両性界面活性剤、非イオン界面活性剤、天然界面活性剤、高分子界面活性剤若しくは特殊界面活性剤を用いる特許請求の範囲第1項に記載の増感発光法。

(3) エクオリン誘導体が変異エクオリン、半合成エクオリン若しくは半合成変異エクオリンである特許請求の範囲第1項に記載の増感発光法。

(4) エクオリンに界面活性剤を共存させることを特徴とする再生エクオリンの安定な保存方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、エクオリン若しくはその誘導体からなる生物発光反応系に界面活性剤を共存させることを特徴とするエクオリンの増感発光法に関する。

〔従来の技術とその問題点〕

発光蛋白エクオリンは、発光オワンクラゲより単離されたカルシウム結合蛋白質で、自然界においては蛋白部分のアポエクオリンと、基質部分のセレンテラワンが、分子状酸素を介して複合体を形成している。この複合体にカルシウムが結合することにより発光する。この発光を利用してカルシウム濃度を測定できる。

本発明者は組換えDNAの手法を用いて、発光オワンクラゲよりアポエクオリンのcDNAをクローニングし、その一次構造を明らかにした(特開昭61-135,486)。

次いで、このcDNAを利用して大腸菌を宿主と

し、固体内及び固体外でのアポエクオリンの生産に成功し(特開昭82-171,833、特開昭83-182,833)、その精製法を確立した(特開平1-132,397)。

さらに、機能遺伝子と結合したエクオリン遺伝子を作製し、その融合蛋白質の生産に成功し(特開昭84-39,396、特開昭85-308,424)、その精製法を確立した(特開平1-99,882)。

そして、これらのエクオリン及びその融合蛋白を用いた金属検出法及び免疫測定法を開発した(特開昭82-381,342、特開平1-74,742)。

本発明は、界面活性剤によるエクオリンの増感発光法に関する報告である。

ところで、エクオリンの有用性は当業者に周知であり、エクオリンの発光を利用して、各種物質を検出することができる。すなわち、免疫測定法やDNAプローブ、バイオセンサーなどのあらゆる測定検出系に応用できるものであり、上述した機能から診断薬等の検査薬として有用であることが予測される。

(4) エクオリンに界面活性剤を共存させることを特徴とする再生エクオリンの安定な保存方法。

本発明の構成と効果につき以下に詳述する。本発明は界面活性剤の触媒効果によるエクオリンの増感発光法であり、たとえば後述の実施例に示す方法で行うことができる。

本発明の方法において、後述するワオキセタン類とは、第1図に示すような四員環ペルオキシド構造を有する化合物で、セレンテラジンとは、第2図に示すような構造を有する化合物で、エクオリンとは、第3図に示すような構造を有する複合体で、エクオリン誘導体とは、例えばアポエクオリン部分が変異アポエクオリンに置換した変異エクオリン、セレンテラジン部分がセレンテラジン誘導体に置換した半合成エクオリンやその両方ともが置換した半合成変異エクオリンである。

また、界面活性剤としては後述第1表に示す化合物等があげられる。増加付与例として期待しうる蛍光物質としては、下記第2表に示す物質等が

本発明者は、上述の技術的事情にかんがみ、研究の結果、界面活性剤によるエクオリンの増感発光法を開発することができた。以上の説明から明らかのように、本発明の目的はエクオリンをより超高感度な測定法に応用するための発光増感技術を提供することである。

[問題点を解決するための手段]

本発明は、下記(1)～(4)の構成を有する。

- (1) エクオリン及びその誘導体を用いる発光法において界面活性物質を共存させることを特徴とする増感発光法。
- (2) 界面活性物質として陰イオン界面活性剤、陽イオン界面活性剤、両性界面活性剤、非イオン界面活性剤、天然界面活性剤、高分子界面活性剤若しくは特殊界面活性剤を用いる前記第1項に記載の増感発光法。
- (3) エクオリン誘導体が変異エクオリン、半合成エクオリン若しくは半合成変異エクオリンである前記第1項に記載の増感発光法。

考えられる。

第 1 表
種々の界面活性剤

1. 陰イオン界面活性剤

- 1.1. セッケン——セッケン、金属セッケン
- 1.2. ロート油——モノボール油
- 1.3. 高級アルコール硫酸エステル塩
- 1.4. アルキルベンゼンスルホン酸塩—ABS, LAS
- 1.5. コーオレフィンスルホン酸塩
- 1.6. リン酸エステル型陰イオン界面活性剤

2. 陽イオン界面活性剤

2.1. アミン塩型陽イオン界面活性剤

アルキルアミン塩型、アミノアルコール脂肪族誘導体型、ポリアミン脂肪族誘導体型、イミダゾリン型

2.2. 四級アンモニウム塩型陽イオン界面活性剤

アルキルトリメチルアンモニウム塩型、クアルキルジメチルアンモニウム塩型、アルキルジメチルベンジルアンモニウム塩型、ピリジニウム塩型、アルキルイソキノリニウム塩型、塩化ベンゼトニウム型

第1表のつづき

3. 両性イオン界面活性剤
- 3.1. アミノ酸型両性界面活性剤
アラニン型、グリシン型
- 3.2. ベタイン型両性界面活性剤
4. 非イオン界面活性剤
- 4.1. 脂肪酸アミド型イオン界面活性剤
- 4.2. 多価アルコール型非イオン界面活性剤
- 4.3. ポリエチレングリコール型非イオン界面活性剤
5. 天然系界面活性剤
- 5.1. リン脂質界面活性剤
- 5.2. アミノ酸型界面活性剤
6. 高分子界面活性剤
- 6.1. 天然高分子界面活性剤
- 6.2. 合成高分子界面活性剤
7. 特殊界面活性剤
- 7.1. シリコン系界面活性剤
- 7.2. フッ素界面活性剤

水で希釈して所要量とし、インキュベート用の溶液を調製する。

上述の調製において、例えばアゴエクオリン(10ng/ μ l)水溶液50 μ lを使用した場合には、200mM Tris HCl 100mM EDTA バッファー20～100 μ l、セレンチラフンの(200ng/ μ l)のメタノール溶液2～10 μ lおよび還元剤としての1-メルカプトエタノール2～10 μ lを混合し、水で希釈して100～2,000 μ l(希釈液)とする。以上の混合希釈操作は、0℃～室温で開放雰囲気中で5分～1時間で行う。

次に希釈液のインキュベートは、好ましくは0℃～15℃の間の一定温度で5～100時間好ましくは10～48時間行う。該インキュベート後の希釈液を所定量(例えば50 μ l)づつチューブに移り、所定濃度に希釈した所定の界面活性剤を添加混合し、0℃～室温の一定温度(例えば4℃)で所定の時間毎にサンプリング(例えば10 μ l)し、該サンプルについて、過剰量の Ca^{2+} 源(例えば30mM CaCl_2 , 30mM Tris HCl(pH7.8)水溶液 100 μ l)を

第2表

(個々の発光物質)

発光物質	発光物質
ベリレン	3,10-ジプロモアントラセン
ルブレン	リボフラビン
ローダミンB	フルオレセイン
DMJ-アラニン	580-メルカプトエタノール
1-メチルコランスレン	クンベリフェロン
ローズベンガル	α-トコフェロール
ペンゾ[α]ピレン	NADH
880-プロリン	ビリドキシン・塩酸塩

注. 880: 1-ニトロベンゾフラザン誘導体。
580: 1-スルホニルベンゾフラザン誘導体

本発明の方法は、例えば次のように行う。

エクオリン若しくはエクオリン誘導体の水溶液の一定量に対して、Tris HCl EDTA バッファーおよびセレンチラフンのメタノール溶液および1-メルカプトエタノールの夫々所要量を混合し、最後に

加えて発光量測定機(ルミフォトメーター)を用いて発光量(すなわちエクオリン活性)を測定する。

なお、上述の界面活性剤の添加において使用する該界面活性剤の種類は限定されず、上述第1表に記載された①陰イオン界面活性剤、②陽イオン界面活性剤、③両性界面活性剤、④非イオン界面活性剤、⑤天然界面活性剤、⑥高分子界面活性剤および特殊界面活性剤のいずれも使用可能である。

なお、界面活性剤の選択は、使用するエクオリン又はエクオリン誘導体の種類、緩衝液の種類および使用量、還元剤の種類および使用量ならびにインキュベーションの条件に適合するように予備試験した上で選択すべきである。

また、上記発光量についての相対活性は、上述の発光量測定試料の調製において界面活性剤を添加しない以外は同様に実施して測定した試料の0時間(注、経過時間ゼロ)のエクオリン活性を100とした%で示した(注、後述第3表参照)。

本発明の方法（前述(1)の発明）は、また、再生エクオリンに界面活性剤を添加することによる再生エクオリンの安定な保存方法である。

再生エクオリンとは、例えば上述のようにアポエクオリンとセレンテラウンとを緩衝溶液中で反応させて得られるエクオリンをいう。再生エクオリン（溶液）に界面活性剤を添加する方法および該添加物に界面活性剤を添加する方法も上述と同様である。後述の第4表から明らかなように、再生エクオリンをそのまゝの状態（注、反応で再生させた溶液状態）で過温に保存してもエクオリン活性（注、発光能力）が最高能力に到達するには、比較的長時間を要する（注、10～20時間若しくはそれ以上）。これに対し、本発明の方法によれば、再生エクオリンに通常の界面活性剤（0.01～10mg/μl好ましくは0.1～1 mg/μl）を添加することによりエクオリン活性を急速に向上させることができ、好ましい添加条件によれば2～4時間で相対活性100%の状態になり、その後も相対活性は向上して好ましい添加条件の下では、100

～160%にも達する。この事實は、該活性に対する界面活性剤の増感的効果を示唆している。

【発明の効果】

本発明のエクオリンの増感発光に関する方法の有用性は、当業者に自明である。また、適当な蛍光物質を共存せしめることにより、エクオリンの発光の増感が可能になる。このような物質自体は、当業者に周知である。

上記の開示により、当業者は、特許請求された本発明を実施できる。しかし、この技術の理解を増すために、本発明に重要なエクオリンの増感発光に使われる手順を実施例によって明らかにする。

【実施例】

実施例1【界面活性剤の共存下におけるエクオリン増感発光の時間経過】

アポエクオリン（10ng/μl）水溶液50μl、100mM Tris HCl（pH7.4）100mM EDTA バッファー50μl、セレンテラウン（200ng/μl）メタノール液5μl、2-メルカプトエタノール5μlを混合し、最後に水で500μlとした。

混合後4℃下に24時間インキュベートした。50μlずつ別のチューブに分取し、それぞれのチューブに界面活性剤（商品名）Tween（20、40、60、80、85）の各種濃度の水溶液50μlを添加し、混合した後、氷水中にインキュベートした。所定の時間ごとに10μlサンプリングし、該サンプルについてルミフォトメーター（TD4000）にて、30mM CaCl₂、30mM Tris HCl（pH7.4）水溶液を100μl添加後の発光量（エクオリン活性）を測定した。その結果を第3表に示す。

第3表

種 類	濃 度 (ng/μl)	(相対活性、%)			
		0hr	1hr	2hr	15hr
Tween 20	1	(223)	(167)	(163)	(170)
	0.1	(122)	(123)	(142)	(140)
Tween 40	1	(117)	(116)	(103)	(120)
	0.1	(90)	(77)	(63)	(26)
Tween 60	1	(125)	(120)	(117)	(117)
	0.1	(117)	(120)	(120)	(48)
Tween 80	1	(133)	(133)	(125)	(112)
	0.1	(116)	(113)	(117)	(167)
Tween 85	1	(115)	(116)	(117)	(145)
	0.1	(95)	(96)	(110)	(175)
なし	0	(100)	(67)	(66)	(28)

実施例2【界面活性剤の共存下における
エクオリン再生の時間経過】

実施例1のエクオリン再生系に種々濃度の界面
活性剤 (Tween 20, 40, 80, 85, 88) を共存さ
せ、本水中で再生した。

所定の時間後にサンプリングし、ルミフォト
メーター (TD4000) にて、30mM CaCl₂、30mM Tris
HCl (pH7.6) 水溶液を 100 μ l 添加後の発光量
(エクオリン活性) を測定した。

その結果を下記第4表に示す。0.1 μ g/ μ l の
濃度では、全ての Tween においてエクオリン発光
の増進がみられたが、再生速度の増加はないよう
であった。

第 4 表 (エクオリン再生の時間経過)

界 面 活 性 剤		(相 対 活 性 、 %)						
種 類	濃 度 (μ g/ μ l)	0.5 hr	1 hr	2 hr	3.5 hr	6 hr	10 hr	23 hr
Tween 20	1	(11)	(18)	(21)	(58)	(111)	(142)	(228)
	0.1	(37)	(84)	(179)	(300)	(432)	(563)	(889)
Tween 40	1	(0)	(5)	(16)	(28)	(47)	(100)	(168)
	0.1	(21)	(58)	(121)	(228)	(342)	(447)	(563)
Tween 80	1	(0)	(0.5)	(11)	(21)	(32)	(47)	(42)
	0.1	(32)	(58)	(83)	(221)	(321)	(411)	(468)
Tween 85	1	(0)	(0)	(5)	(11)	(37)	(53)	(105)
	0.1	(21)	(42)	(121)	(153)	(300)	(400)	(574)
Tween 88	1	(5)	(26)	(68)	(111)	(232)	(279)	(442)
	0.1	(28)	(53)	(153)	(237)	(366)	(516)	(621)
なし	0	(0.5)	(5)	(26)	(53)	(84)	(89)	(100)

以上のことから界面活性剤は、エクオリン再生前であっても再生後であっても、エクオリン発光を増強し、エクオリンの安定な状態を維持することがわかった。

また、第2表に示すような蛍光物質の共存により、さらにエクオリン発光が増強されることが期待できる。さらに、第4図に示すようにエクオリンの発光はジオキセタン中間体を経由して生ずることから、ジオキセタン類やセレンテラジンの化学発光反応においても同様な界面活性剤の増感効果が生ずると予想される。

5. 図面の簡単な説明

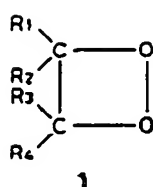
第1～4図は、本発明の説明図である。

第1図は、ジオキセタンの化学構造を示す。第2図はセレンテラジンの化学構造を示す。第3図はエクオリンの構造の概略図を示す。第4図はエクオリンの発光、再生のメカニズムを示す。

以上

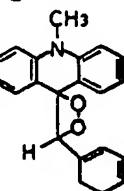
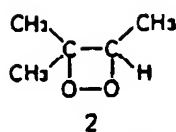
特許出願人 チッソ株式会社
代理人 弁理士 佐々井 彌太郎
同 上 野 中 寛 彦

第1図

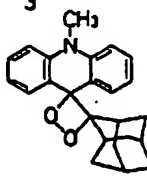
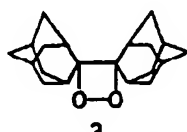


注) R1-R4は
限定されない

ジオキセタンの基本骨格構造



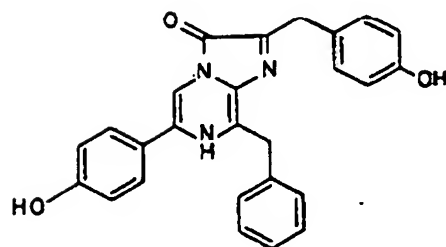
4



5

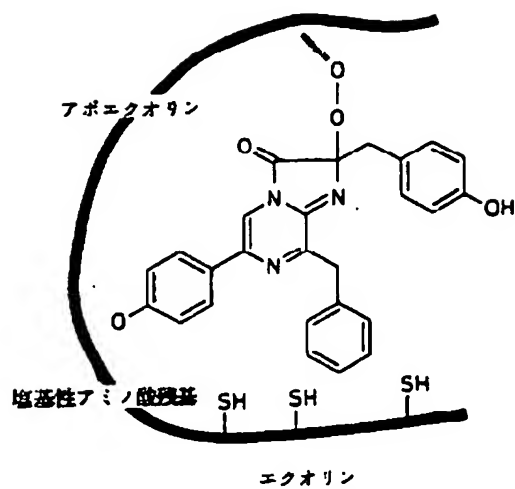
ジオキセタン類の一例

第2図

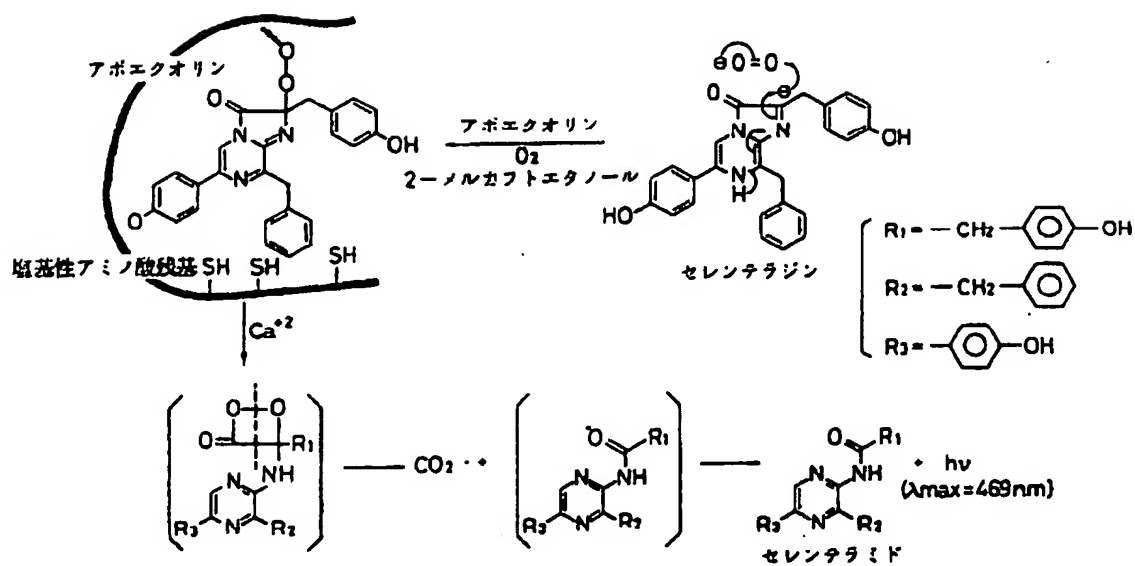


セレンテラジン

第 3 図



第 4 図



エクオリンの発光、再生のメカニズム

特開平3-167288 (8)

平 成 補 正 出

平成2年2月 7日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

平成1年特許願第307,294号

2. 発明の名称

界面活性剤によるエタオリンの増感発光法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

大阪府大阪市北区中之島三丁目6番32号(〒530)

(207) チ ャ ャ ン 株 式 会 社

代表者 野 木 良 雄

4. 代 理 人

東京都中央区築地4丁目4番15号(〒104)

東銀座ロイヤルハイツ403号室

(8851) 弁 理 士 野 中 克 彦

(電話 545-0830)

5. 補正命令の日付

自 発 補 正

方式 ④
審査



6. 補正により増加する発明の数

な し

7. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

8. 補正の内容

明細書をつぎのように訂正します。

(1) 第17頁下から4行目の「ジオクセタン」を
「ジオキセタン」に訂正する。

以 上

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.